F_1 代法监测田间棉铃虫对转 Bt 基因棉的抗性

刘凤沂[1,2]，朱玉成[3]，沈晋良[1,*]

（1. 南京农业大学植物保护学院农药科学系，农业部病虫监测与治理重点开放实验室，南京　210095；
2. 广东省惠州市农业技术推广中心，广东惠州　516001；
3. Jamie Whitten Delta States Research Center，USDA-ARS，Stoneville，MS 38776，USA）

摘要：采用表达单价 Cry1Ac 毒素的转 Bt 基因棉棉叶喂饲法比较了棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）抗、感亲本及正反交后代在 Bt 棉上 5 d 的发育速率，确定棉铃虫在 Bt 棉上 5 d 发育到 2 龄中期以上、体重≥0.6 mg 的个体作为判别抗性纯合子的标准。2006 年采用 F_1 代法在室内用 Bt 棉叶喂饲法检测河北省邱县 Bt 棉田棉铃虫对 Bt 棉的抗性等位基因频率。结果表明，127 头田间雄虫中 24 头携带抗性基因，估测抗性等位基因频率为 0.94(95%CI：0.044～0.145)，该值为在国内首次检测到的高抗性等位基因频率。该地区长期大面积种植转单价 Bt 棉和缺少非 Bt 棉作为有效庇护区导致田间抗性快速进化，需要尽快采取有效的抗性治理策略。本文还讨论了影响大田产生抗性的因素以及田间存在的抗性风险等。

关键词：转 Bt 基因棉；棉铃虫；抗性监测；F1 代法

中图分类号：Q956.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)09-0938-08

Monitoring resistance to transgenic Bt cotton in field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) with F1 screening method

LIU Feng-Yi[1,2]，ZHU Yu-Cheng[3]，SHEN Jin-Liang[1,*]（1. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pest Insects，Ministry of Agriculture，Department of Pesticide Science，College of Plant Protection，Nanjing Agricultural University，Nanjing 210095，China；2. Huizhou Agricultural Technology Extension Centre，Huizhou，Guangdong 516001，China；3. Jamie Whitten Delta States Research Center，USDA-ARS，Stoneville，MS 38776，USA）

Abstract: Development of Bt-susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* and their reciprocal crosses feeding on Bt cotton leaves for 5 d were compared，and individuals ≥0.6 mg/larva and surviving beyond the mid-2nd instar on Bt cotton leaves for 5 d were considered as the standard for homozygous resistant individuals. In 2006，the frequency of allele conferring resistance to Bt cotton in Qiuxian County，Hebei Province，was estimated by using the F_1 screening method. The results showed that 24 out of 127 field-collected male moths were detected to carry resistance alleles and the resistance allele frequency was estimated as 0.094 (95%CI: 0.044 – 0.154). This is the first report that resistance allele frequency increases to such a high level in fields in China. Long-term adoption of Bt sprays，dominant planting of uni-toxin-producing Bt cotton，and lack of conventional cotton refuge system may accelerate the resistance evolution in this region，and it is necessary to establish and implement effective resistance management strategy as soon as possible. Factors influenced resistance evolution and the resistance risk in fields were discussed as well.

Key words: Cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*)；transgenic Bt cotton；resistance monitoring；F_1 screening method

---

基金项目：国家自然科学基金项目(30270889)

作者简介：刘凤沂，1968 年生，山东沂南人，博士研究生，高级农艺师，研究方向为杀虫剂毒理及抗药性，E-mail：2004202017@njau.edu.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：jlshen@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2008-03-17；接受日期 Accepted：2008-08-12

棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）是中国、澳大利亚、印度等国棉花生产的主要害虫之一，它几乎对所有化学农药产生抗性。表达 Bt 毒素的转 Bt 基因棉（简称 Bt 棉）具有对目标害虫高效、对人畜和天敌安全、不污染环境等优点而得到广泛应用。Bt 棉的广泛应用有效地控制了棉铃虫的发生和为害，并减少了化学农药的使用。然而由于大面积商业化种植 Bt 棉以及在棉花整个生育期持续表达杀虫毒蛋白加速了靶标害虫快速适应这种新的生态环境，这将严重威胁转基因作物的有效应用。目前，在室内条件下已经有 10 多种昆虫约 50 多个品系筛选出对 Bt 蛋白或 Bt 作物具有高水平抗性，而且有些害虫已证明能够在转基因作物上存活（叶萱，2004）。据报道，田间小菜蛾 *Plutecia xylostella* Linnaeus 和温室大棚粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 对 Bt 制剂已经产生了抗性（Janmaat and Myers，2003；Tabashnik *et al*.，2003）。可见，田间种群对转 Bt 作物产生抗性是必然的，只是时间问题。

近 10 年来已发展了多种用于检测大田害虫种群对 Bt 抗性的检测方法（Huang，2006），包括剂量-反应法、区分（诊断）剂量法、F_1 代法和 F_2 代法等（Roush and Miller，1986；Gould *et al*.，1997；Andow *et al*.，1998）。由于对 Bt 和转 Bt 作物产生的高水平抗性多数为隐性（或不完全隐性）基因控制的（Akhurst *et al*.，2003；Xu *et al*.，2005；Tabashnik *et al*.，2005），这些检测技术的有效性很大程度依赖于检测到携带隐性（或不完全隐性）抗性基因的能力。单雌系 F_1 代法（简称 F_1 代法）是检测稀有隐性抗性等位基因最有效、灵敏方法之一（Gould *et al*.，1997），内容包括：（1）建立高抗性品系；（2）采集田间雄虫，并与室内抗性处女雌虫单对交配；（3）采用转基因作物或含区分剂量浓度的 Bt 毒素饲料筛选每个单对的 F_1 代幼虫。通过田间雄虫与室内处女雌虫杂交产生的后代期望是具有来自田间抗性等位基因和室内抗性基因的抗性纯合子，从而估测田间抗性等位基因频率。本实验室具有由 Bt 棉筛选获得高水平抗性的抗性品系 YCR（Meng *et al*.，2004）用于 F_1 代法抗性监测。抗性遗传分析表明该品系是由主效基因控制的、常染色体的隐性遗传（周晓梅和沈晋良，2005）。

抗性监测体系的一个关键因素是如何准确区分抗性个体与敏感个体，常规的方法是采用区分剂量法，但由于区分剂量使用的 Bt 毒素与转 Bt 基因作物中的毒素对害虫的毒力是有差别的（National Research Council，2002），而抗性监测的目的是了解田间抗性的真实情况。为此，我们建立一个生长发育速率实验，根据棉铃虫在 Bt 棉上 5 d 的发育速率来从敏感个体中区分抗性个体，为田间抗性监测提供前提条件。在此基础上，采用改进的 F_1 代法于 2006 年检测河北省邱县棉铃虫种群的抗性等位基因频率。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

敏感品系（YCS）：1991 年 7 月采自河南偃师棉田第 2 代，在实验室内不用任何药剂（包括 Bt 生物农药）处理，连续用人工饲料饲养 145 代供测试用。

抗性品系（YCR）：YCS 品系在室内用人工饲料饲养 53 代后用表达 Cry1Ac 毒素的 Bt 棉叶（新棉 33B）筛选 43 代获得对 Bt 棉高抗品系（抗性倍数 1 600 多倍）（Meng *et al*.，2004），用新棉 33B 棉叶继续筛选到 88 代，其抗性倍数达 7 000 多倍供生长发育速率实验。筛选到 91 代供 F_1 代法检测。

正交 F_1（$♀_{YCR}\times♂_{YCS}$）和反交 F'_1（$♀_{YCS}\times♂_{YCR}$）群体

田间种群：2006 年 6 月 19－21 日在河北省邱县南流村用两个黑光灯诱棉田第 2 代棉铃虫雄性成虫（两黑光灯相距约 2 km），每个雄蛾单独放在一个干净塑料杯中供与室内处女雌虫交配。

棉铃虫的人工饲料及饲养条件见沈晋良和吴益东（1995）方法。

1.2　供试棉花

新棉 33B（$NuCOTN33^B$，Bollgard®），由孟山都（Monsanto）远东有限公司提供或购自河北岱字棉公司，表达杀虫晶体蛋白 Cry1Ac。于 2006 年 5 月和 6 月在温室分两批种 Bt 棉，每批种 100～160 盆（宽：高＝11 cm∶15 cm），每盆 5～7 株。使用前采用孟凤霞等（2000）介绍的 Bt 棉叶喂饲法进行棉花抗虫性鉴定。每盆保留毒素表达完全的 4～6 株 Bt 棉供 F_1 代检测。

苏棉 12#（SM-12#），不表达任何杀虫毒素的常规棉作为抗性监测对照棉。由江苏省太仓市棉花原种厂提供。

1.3　抗性棉铃虫在 Bt 棉上 5 d 的发育速率标准的建立

采用叶片喂饲法测定棉铃虫 YCR 和 YCS 亲本及正反交后代在 5～8 叶期 Bt 棉顶部嫩叶上的生长

发育速率：每片嫩叶叶基部包湿脱脂棉保湿，放在干净塑料杯（250 mL）中，用消过毒的小毫毛笔接入5头初孵幼虫，用塑料膜封口并覆盖黑布以避免逃跑，置于温度为27±1℃、相对湿度为60%～80%，光周期14L∶10D条件下，每个品系处理25头初孵幼虫（5杯）。重复4次共100头。由于初孵幼虫在Bt棉取食5 d不能发育到3龄，因此棉铃虫之间不会因相互残杀而影响实验结果。5 d后，检查各品系存活幼虫数、体重及龄期（根据幼虫头壳宽度来确定幼虫龄期）。作为对照，YCR和YCS亲本及正反交后代用5～8叶期苏棉12# 顶部嫩叶处理5 d（方法同上），记录其发育速率。

1.4 F_1 代检测法

1.4.1 F_1 代检测：F_1 代检测法其原理是来自田间雄性成虫（基因型为ss或r′s或r′r′）与室内处女雌虫（rr）单对杂交，产生的 F_1 代初孵幼虫的基因型为rr′或rs，采用高表达的Bt棉叶进行抗性检测。由于室内抗性品系是隐性抗性遗传，因此抗性杂合子rs被杀死，而抗性纯合子rr′存活下来并能达到一定的发育速率，以此检测田间亲本是否携带抗性基因，进而得到抗性等位基因频率。

为保证实验准确性，在准备室内处女雌虫时将雌虫分成若干组，一旦发现有雄虫混杂在某一组中将该组所有雌虫丢弃以保证与田间雄虫交配的雌虫均为处女雌虫。2006年从河北邱县Bt棉大田采集每头雄性成虫与室内筛选91代的YCR91处女雌成虫在250 mL塑料杯中单对交配建立一个单雌系，每天补充4%糖水。来自每个单雌系产生的卵块于5%甲醛消毒3 min后置于29℃孵化。采用与1.3相同方法处理每个单雌系 F_1 代初孵幼虫100～200头。5 d后根据存活幼虫在Bt棉上的发育速率，参照抗性品系在Bt棉叶上5 d的生长发育速率确定存活幼虫是否为抗性个体，进而确定有抗性个体的单雌系为潜在阳性单雌系，这些单对中田间雄性亲本可能携带有抗性等位基因。

1.4.2 F_2 代验证：为消除假阳性单雌系，所有潜在阳性单雌系采用与1.3相同方法进行 F_2 代重新筛查。经 F_1 代检测确定的抗性 F_1 代存活幼虫用干净小毫毛笔将其移至含有人工饲料的玻璃试管中单头饲养，当出现成虫时，在同一个单雌系内进行单对交配。每个单对得到的100头左右 F_2 代初孵幼虫采用与1.3相同方法进行检测。5 d后检查各单对的存活虫数、存活幼虫龄期及体重。经重筛查证实为阳性的单雌系为真阳性单雌系，反之为阴性单雌系。

2 结果与分析

2.1 抗性棉铃虫在Bt棉上5 d的发育速率

YCR和YCS亲本及其正反交后代各100头初孵幼虫取食5～8叶期Bt棉顶部嫩叶5 d的结果表明：YCR幼虫存活率为75%±1.9%，存活幼虫的龄期均为2龄初到3龄。其中幼虫体重≥0.6 mg/头占87.0%±6.1%，0.4～0.5 mg/头占13.0%±5.2%；正交 F_1（♀$_{YCR}$×♂$_{YCS}$）和反交 F'_1（♀$_{YCS}$×♂$_{YCR}$）后代幼虫存活率分别仅6%±1.2%和2%±1.2%。其中正交 F_1（♀$_{YCR}$×♂$_{YCS}$）6个存活幼虫中有2个体重为0.4～0.5 mg/头，其他4个体重均为0.1～0.3 mg/头；反交 F'_1（♀$_{YCS}$×♂$_{YCR}$）仅2个存活幼虫，体重为0.1～0.3 mg/头。YCS亲本幼虫存活率为0%。喂饲苏棉12# 棉叶5 d后，YCR，YCS，F_1 和 F'_1 存活率均达到88%以上，幼虫的发育龄期均为2龄中期以上，其中YCR在常规棉上的存活率为88%。

上述结果表明：抗性和敏感棉铃虫在Bt棉上5 d的死亡率和存活幼虫的发育速率差异显著（$F_{df1,15}$ = 1 458.51，P < 0.0001），YCS不能存活，正反交后代仅有的6%存活个体的体重 < 0.6 mg，龄期也达不到2龄中期，而YCR的存活率达75%，且65%存活幼虫达2龄中期，体重≥0.6 mg（图1）。因此将上述两项指标作为确定抗性纯合子个体的标准，从而来区分抗性纯合子个体与其他基因型个体。

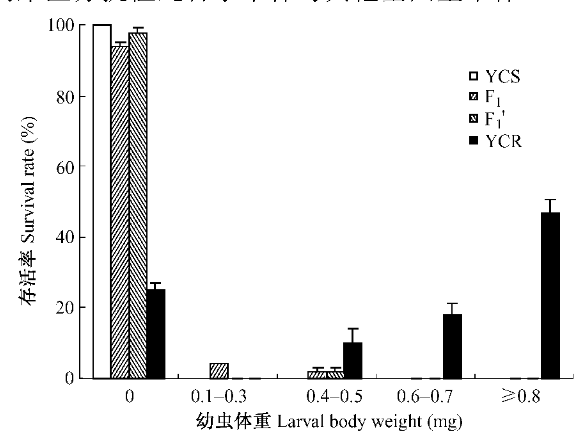


图1 YCR，F_1，F'_1 和YCS喂饲新棉33B棉叶5 d后存活幼虫的体重分布

Fig. 1 Histograms showing the percent and body weight of the surviving larvae of the YCR, F_1（YCR♀×YCS♂）, F'_1（YCR♂×YCS♀）and YCS after 5 d on leaves of Bt cotton

2.2 单雌系 F_1 代法检测田间棉铃虫

2006 年灯下诱集到雄成虫 353 头，与室内抗性品系（YCR_{91}）雌性处女成虫交配获得有效单雌系为 127 个（36.0%）。每个单雌系用 Bt 棉叶平均处理了 159.4 ± 7.3 头 F_1 代初孵幼虫，5 d 后检查结果显示：122 个单雌系有存活幼虫，其他 5 个单雌系无存活幼虫，122 个单雌系的存活率为 0.7% ~ 40%，总计有 2 816 个存活幼虫，幼虫体重从 0.1 mg 到 2 mg 不等，约有 85%的存活幼虫体重低于 0.6 mg。回归分析表明每个单雌系在每个体重的总存活率与体重存在相关性（图 2：A2），当体重增加到 0.7 mg 时 *R*-square 值最大。在 122 个单雌系中有 49 个单雌系的 F_1 存活幼虫在 Bt 棉上发育到 2 龄中期以上、体重≥0.6 mg，平均体重为 0.27 ± 0.01 mg；其他 73 个单雌系存活幼虫均没有超过 0.5 mg，其平均体重为 0.18 ± 0.01 mg。这 49 个单雌系的发育速率与抗性品系的发育速率相似，确定为潜在阳性单雌系，其余的为阴性单雌系。

如果这些潜在阳性单雌系产生的体重达到或大于 0.6 mg 的 F_1 存活幼虫是田间雄虫（rs 或 rr）与室内抗性（r_1r_1）雌虫产生的后代，那么其基因型期望是（rr_1），其自交 F_2 代基因型为 rr 或 rr_1 或 r_1r_1，全部表现为抗性个体，经 F_2 代重新筛查理论上都要在 Bt 棉上存活，而且均达到抗性个体在 Bt 棉上的发育速率，如果潜在阳性单雌系是假阳性的，那么体重达到 0.6 mg 以上的 F_1 存活幼虫（由非遗传因素引起的）则是田间敏感雄虫（ss）与室内抗性（r_1r_1）产生的后代，期望的基因型为 r_1s，其自交有 25%是 r_1r_1 基因型和 50%是 r_1s 基因型。从图 1 可见，在 Bt 棉上抗性杂合子 r_1s 还有 2% ~ 6%的存活率。为防止高估抗性等位基因频率，这里取 F_2 代存活率低于 28%（25% + 6 × 50%）的单对为假阳性单雌系。由于存在适合度代价及不完全抗性等原因，不是所有的抗性棉铃虫能在 Bt 棉上存活，在 F_2 代核查程序里，如果自交 F_2 代单对存活率能够达到 28%以上且有存活幼虫达到抗性标准确定为真阳性单雌系。

49 个潜在阳性单雌系中有 33 个进行了 F_2 代核查，其他 16 个单雌系由于饲养过程中死掉或是产无效卵而无法进行核查。每个 F_2 代单对平均处理 90.6 ± 2.6 头初孵幼虫，33 个单雌系中有 9 个单雌系显示 5% ~ 28%的存活率，均没有超过 28%，因此证实这 9 个单雌系为假阳性单雌系。其他 24 个单雌系的存活率从 29% ~ 67%不等，均高于期望的 28%，确定为真阳性单雌系（图 3）。

2.3 抗性等位基因频率估算

由于来自田间的父本为双倍体，计算邱县种群抗性等位基因频率为 24/（2 × 127）= 0.094，根据二项式分布分别计算出 95%置信限的上下限为 0.044 和 0.145。

3 讨论

棉铃虫对 Bt 棉的抗性是包括中国在内的棉花生产国关心的主要问题，科研工作者为此进行了广泛的研究。然而由于采用不同的检测方法，使用了不同的供试毒素，检测的对象为不同地区的种群，而不同地区 Bt 棉种植、抗性遗传背景和害虫治理情况又各不相同，因此无法对不同地域、不同时间所检测到的不同抗性水平进行比较和分析。在澳大利亚，采用 F_0 和 F_2 代法检测结果表明田间抗性没有显著增加（Bird and Akhurst，2004；Downes *et al*.，2007）。印度 2002 年正式商业化生产 Bt 棉，使用 Cry1Ac 毒素测定 Bt 棉田和非 Bt 棉田棉铃虫种群，Bt 棉田棉铃虫抗性仅有 2 倍增加（Gujar，2005；Gujar *et al*.，2007）。在中国，从 1997 – 2004 年 Wu 等采用区分剂量法检测了田间棉铃虫对 Bt 棉的敏感力，证明田间棉铃虫对 Bt 棉保持敏感性（Wu *et al*.，2002，2006）。然而，最近 Li 等（2007）采用田间直接检测法检测 2002 – 2005 年山东夏津地区的棉铃虫发生田间种群存在非隐性的抗性基因。本研究中，采用田间种群与室内抗性品系棉铃虫单对杂交技术监测河北邱县田间抗性发现：从邱县棉田 127 个样本中检测到有 24 个样本携带有抗性基因，其抗性基因频率达到 0.094（95%CI：0.044 ~ 0.145）。

由于害虫对 Bt 毒素或转 Bt 作物的抗性多数为隐性遗传（Akhurst *et al*.，2003；Tabashinik *et al*.，2004；Xu *et al*.，2005），因此传统的生测方法不能区分 rs 和 ss 个体，而只能依赖于稀有的 rr 个体的检测（Gould *et al*，，1997；Andow *et al*.，1998；Tabashnik，1997）。Gould 等（1997）首次提出并采用 F_1 代法检测美国 4 个洲的烟芽夜蛾得到较高初始抗性频率 1.5×10^{-3}。本文采用改进的 F_1 代法使用 Bt 棉叶而非 Cry1Ac 毒素进行抗性筛选，这与田间实际情况更相近。在检测过程中，保证 Bt 棉高表达 Bt 毒素至关重要：由于不同品种 Bt 棉中毒素表达量不同，同一品种 Bt 棉在不同种植时期和不同部位毒素表达量也不同（周晓梅和沈晋良，2005；Rochester，2006），

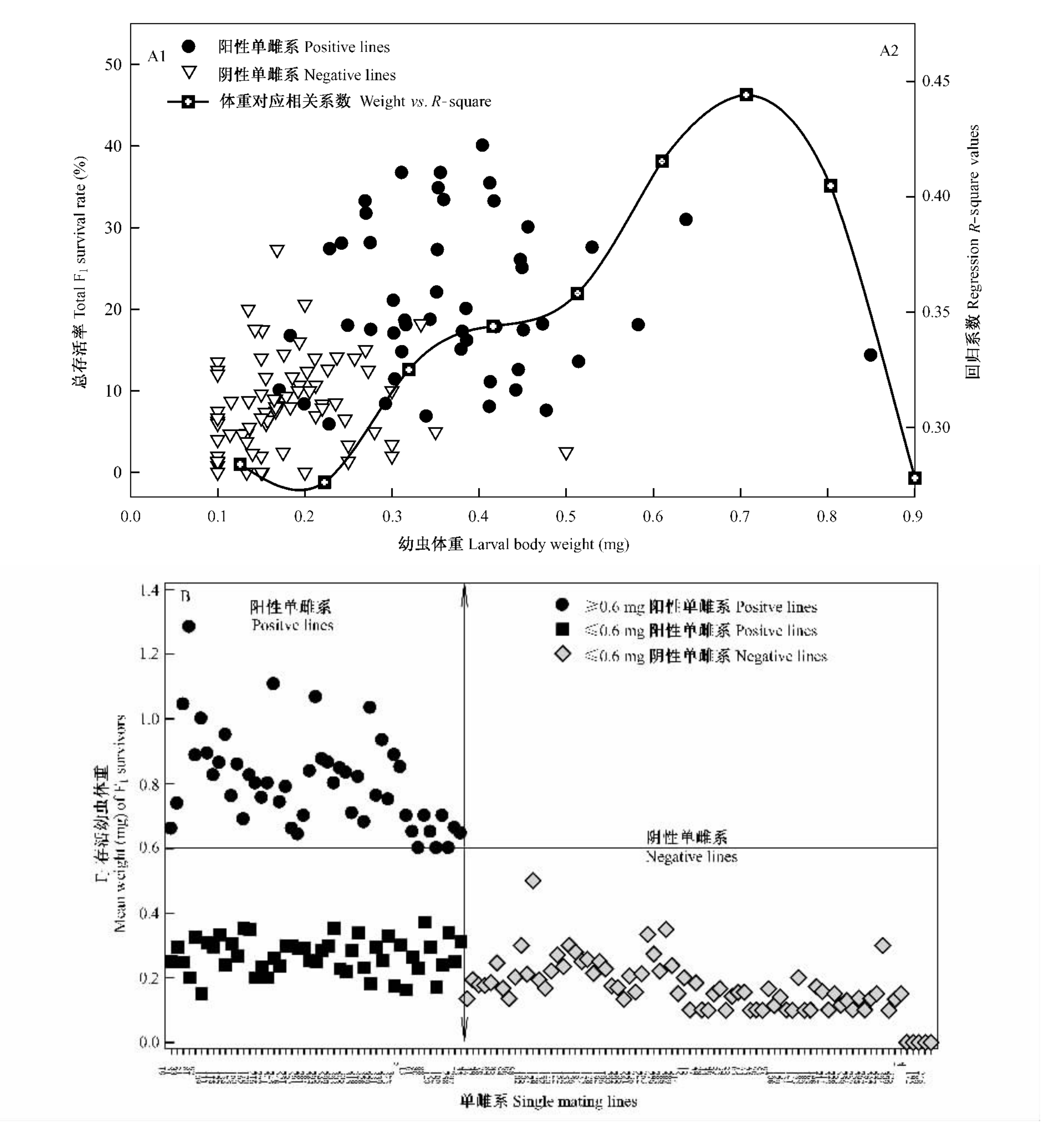


图 2 2006 年在 Bt 棉上 5 d 存活幼虫的体重、存活率分布及其相关分析

Fig. 2 Relationship between larval body weight (mg) and total survival rate established from 2006 F_1 screening on Bt cotton for 5 d

A1: ≥ 0.1 mg 存活幼虫的总平均体重与总存活率的散点分布图 Scatter plot of total survival rate against mean weight of all larvae ≥0.1 mg; A2: 为由不同体重与总存活率的相关系数与各体重之间的回归曲线 Regression curve constructed by plotting the *R*-square values against mean body weight including different weight ranges.

为使检测准确可靠，不仅选择毒素表达量高且稳定的 5～8 叶期 Bt 棉，而且需要对其进行抗虫性检测。该方法的另一个关键之处是判断 F_1 代幼虫是否为抗性个体，为此，研究了抗性品系在 Bt 棉上生长发育速率，建立了区分抗性与敏感个体的检测标准，由此估测抗性等位基因频率来预测田间抗性趋势。另外，由于野生种群 r 基因的抗性水平多种多样可能不同于室内种群 YCR 中 r 的抗性，而且由于存在与 Bt 毒素抗性相关的适合度代价等因素而削弱害虫在转基因作物上的生长发育（Oppert *et al*., 2000; Carrière *et al*., 2001; Janmaat and Myers, 2003; Akhurst *et al*., 2003; 高聪芬等, 2004），导致 F_1 代存活幼虫的发育速率和存活率呈现多样性，而没出现孟德尔遗传分离（1:1）。因此，为防止漏检田间抗性基因，在 F_1 代仅使用生长发育速率一个参数作为评判抗性的标准，但在 F_2 代核查程序中，考虑到适合度代

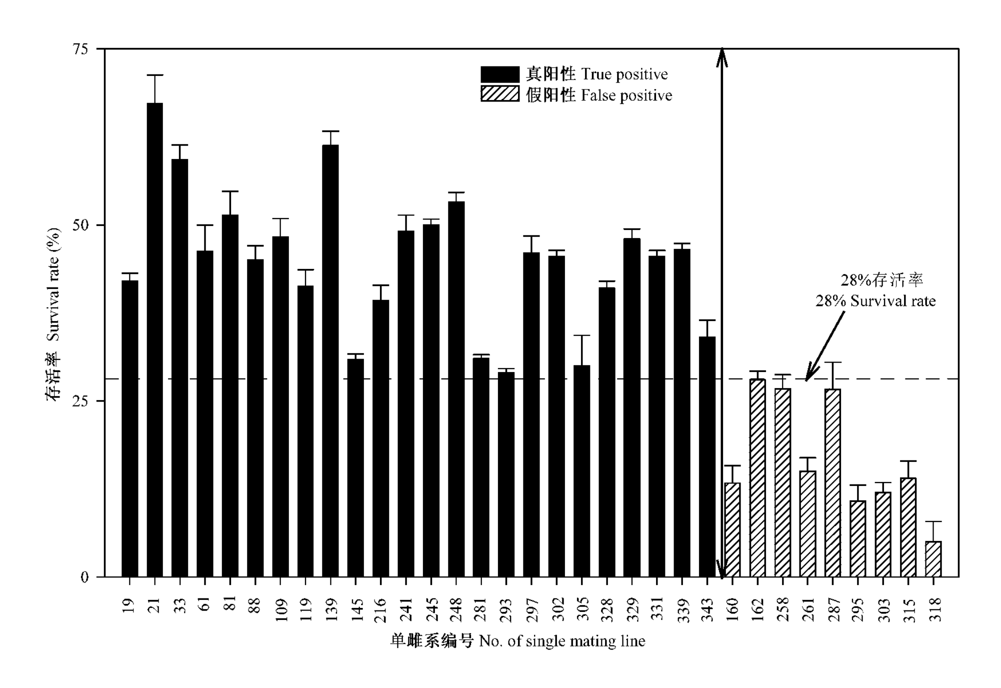


图 3 2006 年邱县 33 个潜在阳性单雌系 F_2 代在 Bt 棉上筛选 5 d 的存活率

Fig. 3 Survival rates of F_2 progenies of 33 potential positive lines after re-screening on Bt cotton for 5 days in 2006

价等因素不仅采用生长发育速率还参照理论存活率使检测程序更加合理。最后，检测样本量（每个单雌系或单对至少要检测 100 头初孵幼虫）对保证实验准确性是又一个关键因素。

该地区 1998 年开始商业化种植 Bt 棉，2000 年何丹军等采用 F_2 代法检测该地棉铃虫种群抗性基因频率为 0.0058（95%CI 为 0 ~ 0.0187）该值已高于庇护区策略要求的低初始频率（$P < 10^{-3}$）（何丹军等，2001）。由于早在 1991 年该地区就使用 Bt 制剂防治棉铃虫，高初始频率可能是 Bt 棉与 Bt 制剂具有交互抗性所致（沈晋良和吴益东，1995）。一些研究认为当初始抗性等位基因频率达到 0.005，在几年内整个种群内将产生抗性（Gould *et al*.，1997；Gould，1998）。本研究检测到抗性等位基因频率已近似 0.1，说明每 100 个个体中将有一个为抗性个体（Gould *et al*.，1997）。多数杀虫剂和转基因作物抗性进化模型显示：当抗性基因频率增加到 0.1，田间防治将在几代内失败（Roush and Miller，1986）。与国内其他地区抗性检测结果相比，该地区抗性频率已显著增加（Wu *et al*.，2002，2006；Li *et al*.，2007；陈海燕等，2007），这可能与较高的抗性初始频率有关。

该地区大范围、长期应用表达单价基因（Cry1Ac）Bt 棉增加了棉铃虫选择压，加速棉铃虫适应这一生态环境（Gould，2003）。自 2001 年起该地区 Bt 棉完全取代常规棉，而常规棉是庇护区最有效的作物（Bird and Akhurst，2007），Wu 等（2003）认为豆类、花生和玉米等可做为自然庇护区起到稀释抗性基因的作用，但作为该地第 2、3 代自然庇护区种植面积很少仅为 3% ~ 4%，虽然作为第 4 代自然庇护区的玉米种植面积较大（20% ~ 30%），但 Bt 棉在生长后期毒素表达量下降，有报道显示 5% ~ 20% 棉铃虫能够存活（Wu *et al*.，2003），可见，自然庇护区在该地区的作用很小。田间调查结果已经显示近 5 年来棉铃虫发生呈逐年上升势态。

高剂量/庇护区策略要求转基因作物高表达 Bt 毒素以杀死敏感杂合子个体。该地区 Bt 棉种植品种繁多，其植株体内毒素表达量各不相同；而且农民用种多为自留种或非正常渠道购种，棉田里植株表达 Bt 毒素水平参差不齐，加上在 Bt 棉的生长后期毒素表达量降低（Wu *et al*.，2003），因此田间 Bt 棉并非都是高表达 Bt 毒素，敏感杂合子甚至抗性个体很容易取食毒素表达量低的部位或植株而存活下来，进而提高了杂合子间交配机率、增加了抗性进化机率。另外，由于存在适合度代价等因素导致抗性与敏感棉铃虫生长发育不同时性以及抗性害虫能够在 Bt 棉上完成整个生长发育，这将影响到庇护区内大量发育速率快的敏感个体与 Bt 棉田少量发速率慢的抗性个体的正常随机交配，从而削弱庇护区的作用（Liu *et al*.，1999；Akhurst *et al*.，2003；高聪芬等，2004）。由此可见，缺乏有效的庇护区和 Bt 棉毒素非高剂量表达（Luttrell *et al*.，1999；Liao *et al*.，

2002)可能是抗性基因频率快速增加的主要原因。

检测田间抗性发展不仅需要经济有效的检测方法还需要理解抗性产生的机制。目前已报道从 3 种鳞翅目害虫(烟芽夜蛾 YHD2、棉红铃虫、棉铃虫 GYBT)鉴定出 5 个抗性突变基因(Gahan *et al*., 2001; Morin *et al*., 2003; Xu *et al*., 2005),且已表明钙粘素基因突变是这些害虫对 Bt 抗性的重要机制。在明确抗性机理的前提下,以 DNA 为基础的分子检测技术因其方便有效而应用于田间抗性检测。目前,该技术已应用于烟芽夜蛾、红铃虫和棉铃虫等害虫(Morin *et al*., 2004; Tabashnik *et al*., 2006; Gahan *et al*., 2007; Yang *et al*., 2007)。结合分子检测与生物检测(F_1/F_2 代法)在监测程序里将使抗性检测更加经济、有效、准确。具有高抗性等位基因频率的河北邱县棉铃虫种群的抗性机理需要进一步研究,有效的分子检测技术也有待进一步发展。

参 考 文 献(References)

Akhurst RJ, James W, Bird LJ, Beard C, 2003. Resistance to the Cry1Ac δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol*., 96: 1 290 – 1 299.

Andow DA, Alstad DN, Pang YH, Bolin PC, Hutchison WD, 1998. Using an F_2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol*., 91: 579 – 584.

Bird LJ, Akhurst RJ, 2004. Relative fitness of Cry1A-resistant and -susceptible *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on conventional and transgenic cotton. *J. Econ. Entomol*., 97: 1 699 – 1 709.

Bird LJ, Akhurst RJ, 2007. Effects of host plant species on fitness costs of Bt resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control*, 40: 196 – 203.

Carrière Y, Ellers-Kirk C, Liu YB, Sims MA, Patin AL, Dennehy TJ, Tabashnik BE, 2001. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol*., 94: 1 571 – 1 576.

Chen HY, Yang YH, Wu SW, Yang YJ, Wu YD, 2005. Estimated frequency of resistance alleles to Bt toxin Cry1Ac in the field populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) from Northern China. *Acta Entomologica Sinica*, 50(1): 25 – 30. [陈海燕,杨亦桦,武淑文,杨亚军,吴益东, 2007. 棉铃虫田间种群 Bt 毒素 Cry1Ac 抗性基因频率的估算. 昆虫学报, 50(1): 25 – 30]

Downes S, Mahon R, Olsen K, 2007. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for Bt-cotton: Current status and future challenges. *J. Invertebr. Pathol*., 95: 208 – 213.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857 – 860.

Gahan LJ, Gould F, López JD Jr, Micinski S, Heckel DG, 2007. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol*., 100: 187 – 194.

Gao CF, Shen JL, Qian Y, Chen J, 2004. Effect of transgenic cotton on the development and activity frequency of high resistant strain of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to Bt cotton. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry* (*Natural Science Edition*), 32(12): 47 – 50. [高聪芬,沈晋良,钱燕,陈进. 2004. 转基因棉对高抗 Bt 棉棉铃虫生长发育及活动频率的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 32(12): 47 – 50]

Gould F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol*., 43: 701 – 726.

Gould F, 2003. Bt-resistance management-theory meets data. *Nat. Biotechnol*., 21: 1 450 – 1 451.

Gould F, Andenson A, Jones A, Sumerford D, Heckel DG, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M, 1997. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3 519 – 3 523.

Gujar GT, 2005. Will Bt cotton remain effective in India? *Nat. Biotechnol*., 23: 927 – 928.

Gujar GT, Kalia V, Kumari A, Singh BP, Mittal A, Nair R, Mohan M, 2007. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. *J. Invertebr. Pathol*., 95: 214 – 219.

He DJ, Shen JL, Zhou WJ, Gao CF, 2001. Using F_2 genetic method of isofemale lines to detect the frequency of resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin from transgenic Bt cotton in cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Gossypii Sinica*, 13(2): 105 – 108. [何丹军,沈晋良,周威君,高聪芬, 2001. 应用单雌系 F_2 代法检测棉铃虫对转 Bt 基因棉抗性等位基因的频率. 棉花学报, 13(2): 105 – 108]

Huang F, 2006. Detection and monitoring of insect resistance to transgenic Bt crops. *Insect Science*, 13: 73 – 84.

Janmaat AF, Myers J, 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci*., 270: 2 263 – 3 370.

Li GP, Wu KM, Gould F, Wang JK, Miao J, Gao XW, Guo YY, 2007. Increasing tolerance to Cry1Ac cotton from cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, was confirmed in Bt cotton farming area of China. *Ecol. Entomol*., 32(4): 366 – 375.

Liao CH, Heckel DG, Akhhurst R, 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *J. Invertebr. Pathol*., 80: 55 – 63.

Liu YB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Bartlett AC, 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature*, 400: 519.

Luttrell RG, Wan L, Knighten K, 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol*., 92: 21 – 32.

Meng FX，Shen JL，Zhou WJ，Gao CF，Tang CM，2000. Studies on bioassay methods for resistance of transgenic Bt cotton to *Helicoverpa armigera*（Hübner）. *Journal of Nanjing Agricultural University*，23（1）：109 – 113.［孟凤霞，沈晋良，周威君，高聪芬，唐灿明，2000.转 Bt 基因棉对棉铃虫抗虫性测定方法的研究. 南京农业大学学报，23（1）：109 – 113］

Meng F，Shen J，Zhou W，Cen H，2004. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera*（Hübner）（Lepidoptera：Noctuidae）. *Pest Manag. Sci.*，60（2）：167 – 172.

Morin S，Biggs RW，Sisterson MS，Shriver L，Ellers-Kirk C，Higginson D，Holley D，Gahan LJ，Heckel DG，Carrière Y，Dennehy TJ，Brown JK，Tabashnik BE，2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，100：5 004 – 5 009.

Morin S，Henderson S，Fabrick JA，Carriere Y，Dennehy TJ，Brown JK，Tabashnik BE，2004. DNA-based detection of Bt resistance alleles in pink bollworm. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34：1 225 – 1 233.

National Research Council，2002. Environmental Effects of Transgenic Plants：The Scope and Adequacy of Regulation. National Academy Press，Washington，D.C. 320.

Oppert B，Hammel R，Thorne JE，Kramer KJ，2000. Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Indianmeal moth，*Plodia interpunctella*. *Entomol. Exp. Appl.*，96：281 – 287.

Rochester IJ，2006. Effect of genotype，edaphic，environmental conditions，and agronomic practices on Cry1Ac protein expression in transgenic cotton. *J. Cotton Sci.*，10：252 – 262.

Roush RT，Miller GL，1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.*，79：293 – 298.

Shen JL，Wu YD，1995. Insecticide Resistance in Cotton Bollworm and Its Management. China Agriculture Press，Beijing. 91 – 95.［沈晋良，吴益东，1995. 棉铃虫抗药性及其治理. 北京：中国农业出版社. 91 – 95］

Tabashnik BE，1997. Seeking the root of insect resistance to transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，94：3 488 – 3 490.

Tabashnik BE，Carrière Y，Dennehy TJ，Morin S，Sisterson MS，Roush RT，Shelton AM，Zhao JZ，2003. Insect resistance to transgenic Bt crops：lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.*，96：1 031 – 1 038.

Tabashnik BE，Dennehy TJ，Carrière Y，2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，102（43）：15 389 – 15 393.

Tabashnik BE，Fabrick JA，Henderson S，Biggs RW，Yafuso CM，Nyboer ME，Manhardt NM，Coughlin LA，Sollome J，Carrière Y，Dennehy TJ，Morin S，2006. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. *J. Econ. Entomol.*，99：1 525 – 1 530.

Tabashnik BE，Liu YB，Unnithan DC，Carrière Y，Dennehy TJ，Morin S，2004. Shared genetic basis of resistance to Bt toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *J. Econ. Entomol.*，97：721 – 725.

Wu KM，Guo YY，Head G，2006. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera*（Lepidoptera：Noctuidae）to Bt insecticidal protein during 2001 – 2004 in China. *J. Econ. Entomol.*，99：893 – 896.

Wu KM，Guo YY，Lv N，Greenplate JT，Deaton R，2002. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera*（Lepidoptera：Noctuidae）to Bt insecticidal protein in China. *J. Econ. Entomol.*，95：826 – 831.

Wu KM，Guo YY，Lv N，Greenplate JT，Deaton R，2003. Efficacy of transgenic cotton containing a *Cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*（Lepidoptera：Noctuidae）in northern China. *J. Econ. Entomol.*，96：1 322 – 1 328.

Xu XJ，Yu LY，Wu YD，2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to CrylAc δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Enoviron. Microbiol.*，71（2）：948 – 954.

Yang YJ，Chen HY，Wu YD，Yang YH，Wu SW，2007. Mutated cadherin alleles of *Helicoverpa armigera* conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac detected in the field. *Appl. Environ. Microbiol.*，73（21）：6 939 – 6 944.

Ye X，2004. Insect resistance to Bt crops. *World Pesticide*，26（2）：33 – 37.［叶萱，2004. 昆虫对 Bt 作物的抗性. 世界农药，26（2）：33 – 37］

Zhou XM，Shen JL，2005. Inheritance and AFLP marker of resistance in *Helicoverpa armigera*（Hübner）to transgenic Cry1Ac cotton. *Acta Gossypii Sinica*，17（5）：269 – 274.［周晓梅，沈晋良，2005. 棉铃虫对转 Cry1Ac 基因棉的抗性遗传及 AFLP 标记研究. 棉花学报，17（5）：269 – 274］

（责任编辑：赵利辉）